

Polyamines capable of trapping metal ions from solution preferably derived from amino acids

Patent number: FR2773808
Publication date: 1999-07-23
Inventor: GEFFARD MICHEL; GEFFARD PHILIPPE
Applicant: SAGEBO (FR)
Classification:
- **international:** C08G73/02; C02F1/58
- **european:** C08G73/02A
Application number: FR19980000547 19980120
Priority number(s): FR19980000547 19980120

Also published as:



WO9936460 (A1)
EP1049736 (A1)

[Report a data error here](#)

Abstract of **FR2773808**

Compounds that are capable of trapping metal ions are: (a) Polyamines obtained by reaction of a diamine (1) with a crosslinking agent; (b) a mixture of such polyamines; and (c) a conjugate of two diamines or polyamines as described linked directly or through a succinic or glutaric anhydride residue. The diamine or mixture of diamines used to prepare the polyamines are of formula $H_2N-A-NR_1$ (1) A = 1-6C alkylene or alkylidene optionally substituted by one or more carboxyl groups, $-(CH_2)_n-CO-$, $-CO-(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_n-NH-(CH_2)_n-$, or $-(CH_2)_n-NH-(CH_2)_n-NH-(CH_2)_n-$; $n = 1 - 6$; $R_1 = H$, 1-6C alkyl optionally substituted by one or more carboxyl groups and/or an imidazolyl. The diamine may also be one prepared by polymerization of a molecule carrying an amine function and an aldehyde function protected by acetal formation, or by reduction of a polyamide. The conjugates of two diamines or polyamines are of formula $X-Y-Z_p$ X and Z = a diamine of formula (1) or a polyamine or mixture of polyamines as defined, or Z may also be a carrier molecule such as polylysine or bovine serum albumin; Y = a direct bond or a succinic or glutaric anhydride residue; $p = 1 - 3$ such that when X is a succinic or glutaric residue and X is (1), then A = alkylene, $-(CH_2)_n-NH-(CH_2)_n-$, or $-(CH_2)_n-NH-(CH_2)_n-NH-(CH_2)_n-$; and $R_1 = H$, or A = $-(CH_2)_2-CO-$ and $R_1 = (imidazol-5-yl)carboxymethyl$. An independent claim is included for a method of recovering metal ions from solution comprising contacting the solution of metal ions with a compounds as described to form a complex, passing the complex through a filtration means to retain or filter the complex, and recovering the metal ions by acid treatment of the retained or filtered complex.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 20.01.98.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 23.07.99 Bulletin 99/29.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : SAGEBO Societe civile — FR.

⑦2 Inventeur(s) : GEFFARD MICHEL et GEFFARD PHI-
LIPPE.

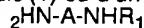
⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CABINET BEAU DE LOMENIE.

⑤4 COMPOSES SUSCEPTIBLES DE PIEGER LES IONS METALLIQUES, LEUR PROCEDE D'OBTENTION ET
LEUR UTILISATION.

⑤7 L'invention concerne des composés susceptibles de
piéger des ions métalliques, choisis parmi:

* une polyamine susceptible d'être obtenue soit par po-
lymérisation d'un agent réticulant et d'une diamine de for-
mule (1) ou d'un mélange de diamines de formule (1):



soit par polymérisation sur elle-même d'une molécule
comportant à la fois une fonction aminé primaire et une
fonction aldéhyde protégée sous forme d'acétal soit par ré-
duction d'un polyamide;

* un mélange de polyamines telles que définies ci-des-
sus; et

* un conjugué de formule:



où A, R₁, X, Y, Z et p sont tels que définis dans la des-
cription.

L'invention concerne également l'utilisation de ces com-
posés ainsi qu'un procédé dans lequel ils sont mis en
oeuvre.

FR 2 773 808 - A1



La présente invention concerne des composés ayant une forte capacité de rétention des ions métalliques et de leurs anions présents dans les milieux aqueux.

Le rendement de complexation doit être élevé et si possible le relargage
5 aisé pour récupérer les ions piégés d'une part et d'autre part recycler les composés utilisés.

Les objectifs recherchés sont donc les suivants :

1)- piéger les ions métalliques et leurs anions présents dans des solutions aqueuses avec des molécules faciles à synthétiser et peu coûteuses, par des
10 méthodes simples ;

2) - obtenir un bon rendement ;

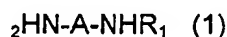
3) - relargage facile de l'ion métallique après avoir été piégé par les composés et réutilisation de ceux-ci ;

4) - quantifier les ions par des méthodes simples, par exemple des tests
15 immunoenzymatiques ;

Ces objectifs sont atteints, conformément à l'invention, par des composés à base de diamine(s).

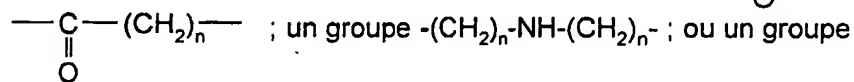
Ainsi, selon un premier aspect, l'invention concerne des composés choisis parmi :

20 * une polyamine susceptible d'être obtenue soit par polymérisation d'un agent réticulant et d'une diamine de formule (1) ou d'un mélange de diamines de formule (1) :



dans laquelle

25 - A représente un (C₁-C₆)alkylène ou alkylidène, éventuellement substitué par un ou plusieurs carboxyles ; un groupe $\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---}\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}\text{---}$; un groupe



$\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---NH---}(\text{CH}_2)_n\text{---NH---}(\text{CH}_2)_n\text{---}$; chaque entier n pouvant prendre les valeurs 1 à 6 ; et

- R₁ représente l'hydrogène ou un (C₁-C₆)alkyle éventuellement substitué par un
30 ou plusieurs carboxyles et/ou un imidazole, soit par polymérisation sur elle-même d'une molécule comportant à la fois une fonction amine primaire et une

fonction aldéhyde protégée sous forme d'acétal, soit par réduction d'un polyamide par un réducteur puissant tel que l'hydrure de lithium et d'aluminium ;

* un mélange de polyamines telles que définies ci-dessus ; et

* un conjugué de formule :

5 $X-Y-Z_p$

dans laquelle

- X et Z représentent indépendamment une diamine de formule (1) ou une polyamine ou un mélange de polyamines tels que définis ci-dessus ; Z peut aussi représenter une molécule porteuse telle que la polylysine et l'albumine sérique bovine ;

- Y représente une liaison directe ou le résidu de l'anhydride succinique ou glutarique ; et

- p est un entier variant de 1 à 3.

Par (C₁-C₆)alkyle, on entend les groupes méthyle, éthyle, n-propyle, i-propyle, n-butyle, i-butyle, s-butyle, t-butyle, n-pentyle, i-pentyle, t-pentyle et hexyle.

Par (C₁-C₆)alkylène ou alkylidène, on entend les radicaux monovalents ou divalents correspondant aux groupes alkyles en C₁-C₆.

Les composés ci-dessus sont dans l'ensemble nouveaux et font partie intégrante de l'invention. Toutefois, la demande WO 96/15810 décrit des conjugués entre la polylysine et la carnitine, la carnosine ou des diamines de formules ${}_2\text{HN-A-NH}_2$ où A représente un (C₁-C₆)alkylène ou un groupe $-(\text{CH}_2)_m\text{-NH-B-(CH}_2)_p\text{-}$, B représentant une liaison directe ou un groupe $-(\text{CH}_2)_n\text{-NH-}$, m, n et p variant de 1 à 5. Ce document décrit aussi l'utilisation de ces conjugués pour la préparation de médicaments utiles dans le traitement de la dégénérescence neuronale, des neuropathies infectieuses, traumatiques ou toxiques, des affections dégénératives à caractère autoimmun ou des affections prolifératives.

L'invention concerne donc les conjugués de formule X-Y-Z où Y représente l'anhydride succinique ou glutarique, Z représente la polylysine et X représente une diamine de formule ${}_2\text{HN-A-NHR}_1$ dans laquelle

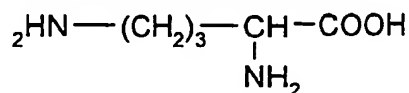
* lorsque A est un (C₁-C₆)alkylène, un groupe $-(\text{CH}_2)_n\text{-NH-(CH}_2)_n\text{-}$ ou un groupe $-(\text{CH}_2)_n\text{-NH-(CH}_2)_n\text{-NH-(CH}_2)_n\text{-}$, R₁ est l'hydrogène ; et

* lorsque A est un groupe $-(\text{CH}_2)_2\text{-C(O)-}$, R₁ est un groupe (imidazol-5-yl)carboxyméthyle,

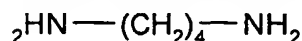
uniquement pour leur utilisation, décrite ci-après pour les composés de l'invention.

De manière avantageuse, la diamine de formule (1) est choisie parmi :

* la L-ornithine, de formule :



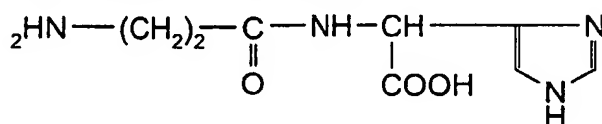
* la putrécine, de formule :



* la cadavérine, de formule :



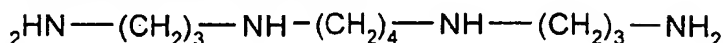
* la L-carnosine, de formule :



* la spermidine, de formule :



* et la spermine, de formule :



Les polyamines selon l'invention comprennent une ou plusieurs unités récurrentes de formule (1). Dans le premier cas, on pourra parler "d'homopolyamine" et dans le second cas, de "copolyamine", par analogie avec la chimie des polymères.

L'invention concerne donc aussi bien les homopolyamines telles que par exemple la poly(L-ornithine), la poly(putrécine), la poly(cadavérine), la poly(L-carnosine), la poly(spermidine) ou la poly(spermine) que les copolyamines comme par exemple les copolyamines spermine/spermidine/cadavérine/L-carnosine ; spermine/spermidine/cadavérine ; spermine/spermidine ; spermine/cadavérine/L-carnosine ; spermine/cadavérine/putrécine/L-carnosine ; ou encore spermine/spermidine/putrécine/L-ornithine.

Selon une variante de l'invention, les copolyamines peuvent également comprendre un acide aminé tel que le tryptophane, la cystéine ou la tyrosine, comme par exemple le copolymère spermine/L-carnosine/cystéine, ou bien encore une molécule possédant au moins un groupement amino.

Avantageusement, le composé conforme à l'invention est un mélange de polyamines, notamment un mélange d'homopolyamines, et de façon préférée un mélange de poly(L-ornithine), poly(putrécine), poly(cadavérine), poly(spermidine) et poly(spermine).

5 D'autres composés préférés selon l'invention comprennent les conjugués de formule X-Y-Z où X représente une diamine de formule (1), Y représente le résidu de l'anhydride succinique ou glutarique et Z représente un mélange de polyamines tel que défini ci-dessus.

Les conjugués de formule X-Y-Z_p où X représente une polyamine, Y
10 représente une liaison directe, Z représente une diamine de formule (1) et p vaut 1 ou 2, sont également des composés préférés selon la présente invention.

Parmi ces conjugués, X représente avantageusement la poly(L-ornithine) ou la poly(L-carnosine) et Z représente la spermidine ou la spermine.

Les polyamines conformes à l'invention peuvent être obtenues par
15 polymérisation d'un agent de réticulation tel que le formaldéhyde, le glyoxal, le malonaldéhyde, le 1,1,3,3-tétraméthoxypropane ou le glutaraldéhyde, et d'une diamine de formule (1) ou d'un mélange de diamines de formule (1). Par exemple, la polymérisation peut s'effectuer selon le protocole en trois étapes suivant :

20 1ère étape :

100 mg de diamine sont dissouts dans 2ml d'acétate 1,5M pH 8, puis on ajoute progressivement 3ml de glutaraldéhyde à 5% sous agitation ; le mélange devient jaune orangé en 5 minutes.

2ème étape :

25 la réduction des doubles liaisons des imines se fait par une solution de NaBH₄ à 0,1M.

3ème étape :

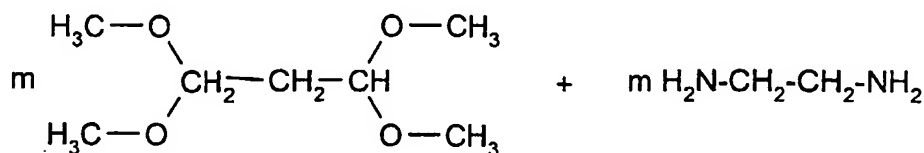
La purification des polyamines est effectuée par dialyse :

- * 1ère dialyse contre de l'eau avec du NaBH₄ pour terminer la réduction;
- 30 * puis 2 autres dialyses contre de l'eau sans NaBH₄.

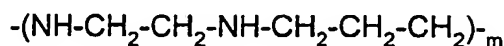
La réduction est complète et la polymérisation bonne dans ces conditions.

Les meilleures polyamines en terme de rendement de polymérisation sont, par ordre décroissant : poly(putrécine) > poly(cadavérine) > poly(L-ornithine) > poly(spermidine) > poly(L-carnosine).

La polymérisation peut également s'effectuer à partir de m molécules de 1,1,3,3-tétraméthoxypropane et de m molécules comportant deux amines primaires comme l'éthylène diamine ou une polyamine :



1/ HCl 0,4N



2/ CH_3COONa

3/ NaBH_4

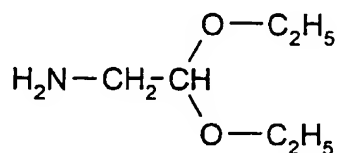
5

selon le protocole suivant :

à l'abri de la lumière, 100 mg de diamine primaire sont dissouts dans 2 ml d'eau, 200 μl d'HCl 4N et 1,088 ml de 1,1,3,3-tétraméthoxypropane. Le mélange est mis à l'étuve à 37°C sous agitation pendant 30 minutes. On ajoute 4 ml d'acétate 3M pH 8. Le mélange est placé à l'étuve à 37°C, sous agitation, pendant 2 heures. Les étapes de réduction des imines et de purification sont effectuées de la même manière que dans la polymérisation au glutaraldéhyde.

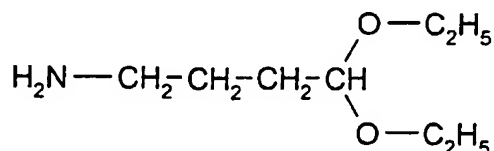
10

De la même façon, la polymérisation peut s'effectuer à partir de l'aminocétaldéhyde-diéthylacétal :

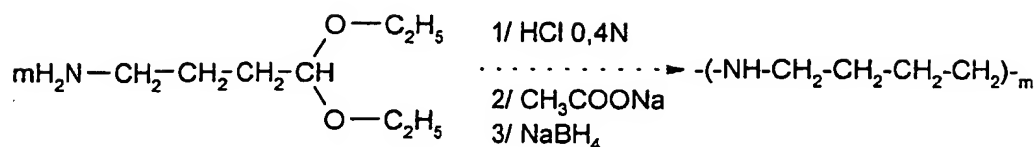
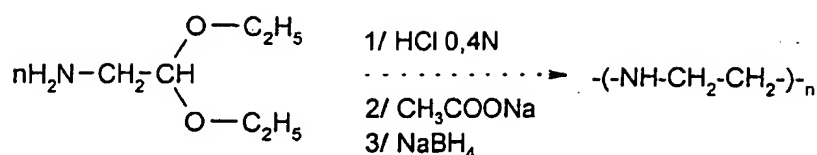


15

ou de l'aminobutyraldéhyde-diéthylacétal :



En transformant l'acétal en aldéhyde, la molécule se polymérise sur elle-même :



Le protocole mis en oeuvre est le suivant :

à l'abri de la lumière, 100 mg d'acétal sont dissouts dans 2 ml d'eau et
 5 200 µl d'HCl 4N ; le mélange est mis à l'étuve à 37°C sous agitation pendant 30
 minutes. On ajoute 4 ml d'acétate 3M pH 8. Le mélange est placé à l'étuve à
 37°C, sous agitation, pendant 2 heures. Les étapes de réduction des imines et
 de purification sont effectuées de la même manière que dans la polymérisation
 au glutaraldéhyde.

10 Les conjugués de formule X-Y-Z selon la présente invention peuvent être
 obtenus par les méthodes de couplage bien connues de l'homme du métier,
 entre un groupe fonctionnel de chacune des molécules X et Z, éventuellement
 par l'intermédiaire de l'anhydride succinique ou glutarique. Des exemples d'agent
 de couplage utilisable aux fins de l'invention incluent notamment le carbodiimide,
 15 le chloroformiate d'éthyle ou l'hexaméthylène diisocyanate.

Ainsi, le composé Y est par exemple glutarylé ou succinylé de la façon
 suivante : 10 mg du composé Y sont dissouts dans 1 ml d'eau [ou 200 µl de
 diméthylsulfoxyde (DMSO) et 800 µl d'eau], on ajoute 8,5 mg d'anhydride
 succinique ou glutarique et 85 µl de soude 1N en vortexant le mélange. A l'issue
 20 de cette étape, on congèle et lyophilise la solution. Le produit lyophilisé est le
 composé : Y-succinylé ou Y-glutarylé avec un carboxyle libre qui pourra être
 activé à la carbodiimide (milieu aqueux) ou au chloroformiate d'éthyle (ECF,
 solvant anhydre).

Dans le cas du couplage à la carbodiimide [1-éthyl-3-(3-
 25 diméthylaminopropyl, carbodiimide], 10 mg de composé Y-succinylé ou Y-
 glutarylé sont dissouts dans 5 ml de tampon morpholinoéthanesulfonique
 (tampon MES) à 0,1M pH 5,4. Dans ce mélange, on ajoute 20 mg du composé
 X-Z ayant des groupements NH₂. Le couplage se fait en ajoutant

progressivement 20 mg de carbodiimide en 15 minutes et en ajustant le pH à 5,4 par un ajout d'HCl 1N.

Dans le cas du couplage à l'ECF, 10 mg de composé Y-succinylé ou Y-glutarylé sont dissouts dans 2 ml de DMSO anhydre ou 2 ml de diméthylformamide anhydre (DMF) ou 2 ml de méthanol anhydre auxquels on
5 ajoute 40 µl de triéthylamine anhydre (TEA). Les groupes carboxyles sont activés par l'addition de 400 µl d'ECF préalablement dilué au 1/16, 15 minutes, sous agitation et à 4° C. Dans le même temps, on dissout à part 20 mg du composé X-Z dans 2 ml d'eau avec 40 µl de TEA. Après 15 minutes, on verse
10 sur la solution du composé X-Z le mélange Y-succinylé ou Y-glutarylé.

Le produit Y-succinylé ou Y-glutarylé est accroché à l'ensemble X-Z. Le composé final est purifié par dialyse(s) contre de l'eau à l'équilibre.

Une évaluation électrophorétique du degré de polymérisation des conjugués X-Y-Zp sur gel acrylamide a permis de définir une taille comprise en
15 général entre 16 et 22 kDa.

Lorsque Z représente la polylysine ou l'albumine sérique bovine, on pourra se référer à la méthode de couplage décrite dans WO 96/15810.

Les composés selon la présente invention ont une excellente capacité à piéger des ions métalliques en solution par formation d'un complexe de
20 coordination avec lesdits ions.

Ils peuvent par conséquent être utilisés pour récupérer des ions métalliques présents dans diverses solutions.

Ainsi, selon un autre aspect, l'invention concerne un procédé pour récupérer des ions métalliques en solution, qui comprend les étapes suivantes :

- 25
- la mise en contact d'une solution contenant des ions métalliques avec un composé tel que défini ci-dessus pour former un complexe ;
 - le passage du complexe sur un dispositif de filtration pour retenir ou filtrer le complexe ; et
 - la récupération des ions métalliques par traitement à l'aide d'une solution
30 acide du complexe retenu ou filtré.

Comme dispositif de filtration, on utilise avantageusement un appareil de dialyse, une membrane d'ultrafiltration ou de préférence une colonne de chromatographie par affinité.

Dans ce dernier cas, il est nécessaire que le pH de la colonne soit maintenu à une valeur supérieure ou égale à 8 lors du passage du complexe afin de maintenir les groupements -NH- ou -NH₂ des diamines et/ou des polyamines sous cette forme.

- 5 La récupération des ions métalliques se fait par addition au dialysat d'une solution d'un acide minéral tel que l'acide chlorhydrique ou d'un tampon acide organique tel qu'un tampon glycine, ou lavage de la membrane ou de la colonne par une telle solution.

10 Il est ensuite possible, si on le souhaite de récupérer le métal lui-même par électrolyse spécifique du dialysat.

Un autre avantage du procédé conforme à l'invention réside dans le fait qu'il est possible de régénérer les composés utilisés, notamment par traitement du filtre utilisé avec une solution tampon dont le pH est supérieur ou égal à 7,4. Le procédé conforme à l'invention est donc à la fois simple et économique.

- 15 Grâce à leurs propriétés, les composés conformes à l'invention peuvent être utilisés dans différentes applications, par exemple :

1/ - dans le traitement des eaux contaminées, notamment :

- 20 1' - Les eaux peu chargées en ions mais à la limite du seuil de consommation ;

- 2' - Les eaux très chargées en ions ;

3' - Les eaux consommables mais devant être traitées pour obtenir ensuite des eaux ultrapures (laboratoires d'analyses médicales, de recherche, pharmaceutiques, etc, ...).

- 25 2/ - pour la capture d'autres molécules non ionisées telles que les hydrocarbures polycycliques aromatiques [benzo(a)pyrène, diméthylbenzanthrène] et autres composés cycliques toxiques et cancérigènes ;

3/ - dans des applications biomédicales :

- 30 1' - L'administration de ces composés non toxiques (vérifiée par l'administration à des animaux sains) peut être envisagée dans des cas d'intoxication ionique aiguë ou chronique chez des sujets exposés ;

2' - Ces composés peuvent être prescrits comme chélatants de toute surcharge métallique, chronique (sujets exposés du fait de leurs conditions de travail) ;

3' - Leurs applications *in vivo* peuvent également être étendues au piégeage d'autres composés non ioniques et notamment à certains composés cycliques circulant dans les liquides biologiques et les tissus.

L'invention va maintenant être illustrée par les exemples ci-après. Dans ces exemples, on utilise les abréviations suivantes :

- AG : anhydride glutarique
- ASB : albumine sérique bovine
- CARN : L-carnitine
- CD : cadavérine
- 10 ED : éthylènediamine
- G : résidu de glutaraldéhyde réduit
- MDA : para, para'-méthylènedianiline
- mélange 1 : poly(ORN-G) + poly(PU-G) + poly(CD-G) + poly(SPD-G) + poly(SPM-G)
- 15 mélange 2 : poly(SPD-G) + poly(SPM-G)
- ORN : L-ornithine
- PL : poly-L-lysine
- PU : putrécine
- SPD : spermidine
- 20 SPM : spermine
- W : tryptophane.

EXEMPLE 1 : Filtration par dialyse

1 - Piégeage/relargage du cuivre

- a) - 2 ml d'une solution contenant du sulfate de cuivre, mis en contact avec un composé selon l'invention, sont dialysés contre de l'eau (1litre). Un échantillon du dialysat est porté au Laboratoire Départemental d'analyse des Eaux de Pau pour quantifier la quantité d'ion métallique relarguée.

Sel (2 mg)	Complexant (5 mg)	Quantité d'ion métallique relarguée (µg/l Cu ²⁺)
CuSO ₄	poly(CD-G)	4
CuSO ₄	poly(ORN-G)	7,7

CuSO ₄	poly(SPD-G)	8,6
CuSO ₄	poly(PU-G)	23,6
CuSO ₄	poly(SPM-G)	1,6
CuSO ₄	mélange 1	4
CuSO ₄	mélange 1	3

Chaque complexant piège les ions. Mais par ordre décroissant d'efficacité nous trouvons : poly(SPM-G) > mélange 1 > poly(CD-G) > poly(ORN-G) > poly(SPD-G) > poly(PU-G).

- 5 La quantité d'ion Cu²⁺ relarguée a été déterminée selon les techniques usitées au laboratoire départemental d'analyse des eaux de Pau : le CDERE. Dans ce laboratoire, on a utilisé les méthodes de quantification des ions appelées :

- 10 -torche à auto-plasma;
-flamme ;
-four.

b) - Plusieurs rapports de quantité ont été testés avec le mélange 1 :

Sel (1 mg)	Quantité de Complexant	Quantité de Cu ²⁺ relarguée dans 1ml de dialyse (µg/l)
CuSO ₄	1mg	1,4 (1h30) 5,9 (60h)
CuSO ₄	2mg	0,8 (1h30) 6,3 (60h)
CuSO ₄	5mg	3,9 (1h30) 4,1*(60h)
CuSO ₄	10mg	6,3 (1h30) 2,5 (24h)

* µg/ml

Pour chaque complexation, 2 dialyses ont été faites. C'est entre 7,1 et 8,8 μg de Cu^{2+} qui sont relargués. (Le piégeage est aussi efficace pour le rapport 1/1 que celui 1/10).

c) - Comparaison des composés synthétisés :

5

Sel (2 mg)	Complexant (5mg)	Quantité de Cu^{2+} relarguée en 1h30 ($\mu\text{g/l}$)
CuSO_4	ASB	6,7
CuSO_4	poly(ASB)	14,1
CuSO_4	ASB-AG	5,6
CuSO_4	CARN-AG-ASB	60,2
CuSO_4	CARN-AG-mélange 1	7
CuSO_4	CARN-AG-PL	3
CuSO_4	SPD-AG-ASB	49,9
CuSO_4	SPM-AG-mélange 1	7,6
CuSO_4	ORN-AG-mélange 1	17,2
CuSO_4	ORN-AG-ASB	5,8
CuSO_4	PU-AG-mélange 1	4,1
CuSO_4	ORN-AG-PL	9
CuSO_4	CD-AG-mélange 1	2,5
CuSO_4	PU-AG-ASB	7,4
CuSO_4	PU-AG-mélange 1	8,2
CuSO_4	PU-AG-PL	10,7

Les meilleurs composés sont : CD-AG-mélange 1 ; CARN-AG-PL et PU-AG-mélange 1.

Sels (2 mg)	mélange 2	Quantité d'ion relarguée dans 1 litre ($\mu\text{g/l}$)
$\text{ZnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$	5mg	38,1
AgSO_4	5mg	0,3
$\text{NiSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	5mg	10
$\text{CdSO}_4, 8\text{H}_2\text{O}$	5mg	0,4
$\text{AuCl}_2, 3\text{H}_2\text{O}$	5mg	<100
Li_2CO_3	5mg	310

A part les ions Li^{2+} et Zn^{2+} , les autres sont très bien piégés par le mélange 2.

3- Comparaison du mélange 2 avec le conjugué MDA-ASB (au départ
5 2 mg de sel pour 5 mg de complexant)

Cd^{2+} : 47,5 fois mieux retenu par le mélange 2 ;

Zn^{2+} : 8,43 fois mieux retenu par le mélange 2 ;

Cu^{2+} : 6,3 fois mieux retenu par le mélange 2.

4 - Etude du relargage

10 A partir d'un complexe traité par HCl ($\text{pH} \approx 1,2$), les 2 dialysats sont analysés :

1er : 75,5 $\mu\text{g/l}$ de Cu^{2+} ;

2ème : 7,5 $\mu\text{g/l}$ de Cu^{2+} .

15 Une grande partie du Cu^{2+} piégé par le mélange 2 est relargué après traitement acide. Le mélange 2 est pH-sensible, donc après traitement permet un recyclage des ions retenus. On peut prévoir une réutilisation des polyamines après lavage dans des solutions tampons dont le $\text{pH} > 7,4$.

EXEMPLE 2 : Filtration par ultrafiltration tangentielle

1 - conditions expérimentales :

20 On utilise 400 mg du mélange 1 dissous dans 2 litres d'eau chargée en CuCl_2 et dont la concentration est de 26,24 g/l. On fait passer au moyen d'une pompe péristaltique, les deux litres dans la cartouche de filtration (Prep-Scale MILLIPORE). Lors d'essais, il a été noté que l'eau ultrafiltrée était plus

concentrée en cuivre en fin de filtration. Ainsi, l'eau ultrafiltrée a été récupérée 125 ml par 125 ml de manière à pouvoir doser le cuivre non retenu.

2 - Résultat

Comme on peut le voir sur la figure 1, le rapport de la concentration en cuivre de la solution ultrafiltrée sur la concentration en cuivre initiale (C_f/C_i) augmente lorsque le volume ultrafiltré (V) augmente.

EXEMPLE 3 : Filtration par chromatographie

3.1 - conditions opératoires de pH

La colonne est constituée de 2 g de gel Sepharose activé au bromure de cyanogène (REF : Pharmacia Code N° 17-0430-01) sur lequel a été fixé un mélange de polyamines (mélange 1).

Le volume de la colonne est de 7,4 ml.

Une solution de 800ml ayant 10 g/l de CuCl_2 dont le pH initial est de 4,4, est ajustée à pH 6,2 grâce à l'addition de soude. Selon les courbes de références le cuivre précipite. On récupère le précipité sur papier filtre, la solution est ensuite passée sur colonne.

On prélève ensuite les échantillons suivants :
échantillon N°:

- 0 : 10 ml de la solution à dépolluer
- 1 : 10 ml de la solution filtrée en début de filtration (100 ml)
- 2 : 10 ml après 500ml filtrés
- 3 : 10 ml après 800 ml filtrés
- 4 : 10 ml sur la solution totale filtrée
- 5 : 10 ml après lavage par 48 ml d'HCl 1 N

La concentration de l'échantillon 0 en Cu^{2+} est de 3 mg/l. Donc, la quantité de Cu à retenir est de 2,4 mg.

N° échantillon	volume d'eau filtrée	Concentration en mg/l de Cu^{2+}	Rapport de la concentration de Cu^{2+}
1	100 ml	0,00921	325,7
2	500 ml	0,0113	265,4
3	800 ml	0,4698	6,385

La concentration de l'échantillon 4, qui correspond aux 800 ml d'eau filtrée sur la colonne, est de 61,22 µg/l. Elle nous donne la quantité de Cu^{2+} retenue par la colonne, 2,351 mg et le pourcentage de Cu^{2+} retenu est donc de 97,95%.

5 La concentration de l'échantillon 5, qui correspond à l'élution, est de 43,94 mg/l. Elle nous donne la quantité de Cu relarguée, 2,197 mg.

Au cours du passage de la solution de Cu^{2+} sur la colonne on a rajouté 20 ml de tampon phosphate salé (PBS) à pH 7,4 dans la solution, car le pH était en train de décroître rapidement. On a remarqué quelques temps après que la coloration bleu de la colonne était de plus en plus importante.

Ces expérimentations ont permis de définir que le contrôle du pH est primordial pour une bonne rétention des ions.

Une nouvelle colonne a ensuite été faite contenant :

- 1,5 gr de Sépharose activée sur laquelle de la poly(SPD-G) est fixée ;
- 15 - 0,5 gr de Sépharose activée sur laquelle du Tris est fixé.

Volume de la colonne : 7,4 ml.

Sur les billes, 150 mg de poly(SPD-G) par gramme de billes ont été fixés, ce qui est un très bon rendement.

La filtration d'une solution d'un litre ayant du CuSO_4 dont le pH=6,4 a été faite à l'aide de cette colonne.

On note que la colonne n'était pas saturée, au vu de la coloration donnée par le Cu^{2+} retenu.

La prise d'échantillons a été faite ainsi:

-échantillon N°:

- 25 3.0 : 10 ml de la solution à dépolluer à 12,15 mg/l
- 3.1 : 10 ml de la solution filtrée en début de filtration (100 ml)
- 3.2 : 10 ml après 200ml filtrés
- 3.3 : 10 ml „ 300ml "
- 3.4 : 10 ml „ 400ml "
- 30 3.5 : 10 ml „ 500ml "
- 3.6 : 10 ml „ 600ml "
- 3.7 : 10 ml „ 700ml "
- 3.8 : 10 ml „ 800ml "

3.9 : 10 ml „ 900ml "

3.10 : 10 ml „ 1 litre "

3.11 : 10 ml de la solution totale filtrée

3.12 : 10 ml après lavage par 100 ml d'HCl 1 N

- 5 - Le débit de la colonne est de 500 ml/h
 - l'échantillon 3.11 a un pH de 9,3, $c=0,00617\text{mg/l}$
 - A l'observation, on a noté un problème d'homogénéité sur la colonne ayant le Cu^{2+} .

10 La concentration en Cu^{2+} est divisée par 1969,2 entre l'eau de sortie et celle à dépolluer ce qui confirme la nécessité du couplage avec le Tris pour maintenir un pH supérieur à 8 afin de maintenir les groupements NH_2 et NH sous cette forme.

N° échantillon	volume d'eau filtrée	Concentration en mg/l de Cu^{2+}	Rapport de la concentration de Cu^{2+}	pH
3.1	100ml	0,00255	4764,7	9,8
3.2	200	0,00711	1708,8	9,6
3.3	300	0,00101	12029,7	9,36
3.4	400	0,01414	859,26	9,36
3.5	500	0,00296	4104,7	9,15
3.6	600	0,01726	703,93	9,13
3.7	700	0,03273	371,2	8,97
3.8	800	0,00069	17608,7	8,7
3.9	900	0,00180	6750	8,5
3.10	1 litre	0,00009	135000	8,25

- 15 La quantité de Cu^{2+} retenu sur la colonne est de 11,8 mg.
 Le pH a été très bien contrôlé par l'addition de gel ayant du Tris.

3.2 - Extension à d'autres ions métalliques

Sur la même colonne que précédemment :

- on réalise un essai de filtration d'une solution de Zn^{2+} ($ZnSO_4$) ;

- on précipite à $pH=9,9$, on passe la solution sur papier filtre et on ramène la solution à un $pH=7,2$ pour voir si il y a un effet tampon suffisant.

5 - La prise d'échantillons a été effectuée ainsi :

échantillon N°:

7.0 : 10 ml de la solution à dépolluer (concentration 21,596 mg/l)

7.1 : 10 ml de la solution filtrée en début de filtration (100 ml)

7.2 : 10 ml après 300ml filtrés

10 7.3 : 10 ml , 500ml ,,

7.4 : 10 ml , 700ml ,,

7.5 : 10 ml , 900ml ,,

7.6 : 10 après un litre ,,

7.7 : 10 ml de la solution totale filtrée

15 7.8 : 10 ml après lavage par 20 ml de tampon glycine

N° échantillon	volume d'eau filtrée	Concentration en mg/l de Zn^{2+}	Rapport de la concentration de Zn^{2+}	pH
7.1	100 ml	0,0001	215960	9,91
7.2	300	2,547	8,478	8,17
7.3	500	7,468	2,89	7,5
7.4	700	15,236	1,417	7,04
7.5	900	15,860	1,361	7,02
7.6	1000	18,34	1,177	6,97

La concentration en Zn^{2+} de la solution filtrée (échantillon 7.7) est de 14,36 mg/l.

20 Donc, la quantité de Zn^{2+} qui a été capturée est de 7,23 mg.

On remarque que pour les ions Zn^{2+} il est nécessaire d'augmenter la quantité de Tris fixé sur le gel pour avoir une décroissance du pH plus lente et obtenir un bon rendement de piégeage de ces ions.

3.3 - conclusion

- 5 - le système colonne est applicable en milieu industriel. Son coût est faible en comparaison des moyens dont disposent les industriels à l'heure actuelle, comme les résines échangeuses d'ions ;
- il permet : - d'apprécier rapidement les améliorations du procédé ;
 - de vérifier le bon fonctionnement de la filtration ;
- 10 - d'optimiser les applications de notre méthode à un faible coût.

EXEMPLE 4

a) Synthèse

15 On a couplé sur le long de la chaîne de la polyamine une très grande quantité de fonctions ayant un pouvoir tampon comme NH_2 ou NH pour accroître la capacité de rétention de la polyamine. La synthèse a été effectuée comme suit :

- 1°- Préparation d'une copolyamine comprenant 60% (en poids) de spermidine et 40% d'ornithine, notée $SPD_{0,6}ORN_{0,4}-G$;
- 20 2°- Activation des groupement $COOH$ de la copolyamine par le carbodiimide ;
- 3°- Couplage des molécules comportant deux amines primaires ;
- 4°- Test pH pour permettre la mise en évidence de l'amélioration du pouvoir tampon.

25 Les molécules couplées sont respectivement l'éthylènediamine, la putrécine, la cadavérine, la spermidine et la spermine. On part de l'hypothèse selon laquelle plus la chaîne carbonée sera longue d'une part et plus le nombre de groupements NH_2 ou NH sera important, meilleur sera l'effet donneur et la capture des ions H^+ par les doublets libres des groupements NH_2 ou NH .

30 b) Résultats :

b_1 - La copolyamine 0 est la copolyamine de référence : $SPD_{0,6}ORN_{0,4}-G$.

 En comparant chaque copolyamine à des pH de référence, on peut évaluer d'une part si le couplage par le carbodiimide a bien eu lieu et d'autre part si le pouvoir tampon a été amélioré.

N° de la copolyamine (molécule couplée)	pH avec 1 ml de NaOH 1 N	pH après le rajout de 26 ml de HCl 10^{-3} M
0	10,05	7,79
1 (ED)	10,05	7,98
2 (PU)	10,05	8,47
3 (CD)	10,05	8,32
4 (SPD)	10,05	8,78
5 (SPM)	10,05	8,92

La copolyamine ayant le plus grand nombre de NH et de NH₂ a un pouvoir tampon plus élevé donc ici la copolyamine 5 qui correspond à la copolyamine sur laquelle a été couplé la spermine par le carbodiimide.

b₂ - Vérification de l'amélioration de l'effet tampon

Un test pH est réalisé entre la copolyamine 5 et le mélange 2, qui jusqu'à présent est celui qui a le plus fort pouvoir tampon.

Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant :

10

(co)polyamine	pH avec 1 ml de NaOH 1 N	pH après le rajout de 45 ml HCl 10^{-3} M
N° 5	9,68	8,01
mélange 2	9,68	7,71

La polyamine qui a le pouvoir tampon le plus important est la copolyamine 5.

Des résultats identiques sont obtenus avec la copolyamine ORN_{0,8}SPD_{0,2}-G.

EXEMPLE 5

Pour évaluer l'intérêt biomédical des copolyamines selon l'invention, on a testé un copolymère contenant du tryptophane, dénommé SPD_{0,7}W_{0,3}-G, sur les modèles d'encéphalite allergique expérimentale (EAE) et d'encéphalite allergique expérimentale chronique à rechutes (EAE-CR).

Ces modèles ne prennent pas en compte tous les aspects de la sclérose en plaque. Mais, leurs composantes inflammatoire et démyélinisante sont une

bonne approche de la poussée aiguë de la maladie (Hashim et al., J. Immunol. 1978 : 121, 665-670 ; Chou et al., J. Immunol. 1979 : 123, 1540-1543 ; Feurer et al., J. Neuroimmunol. 1985 : 10, 159-166 ; Mannie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985 : 82, 5515-5519 ; Raine, in Koestler J.C., Handbook of clinical
5 neurology : Demyelinating Diseases 1985 : 3 (47), 429-466, Elsevier Science Ed. ; Wilcox et al., Immunol. 1989 : 67, 435-440).

Plusieurs séries de rates Lewis, souche génétiquement susceptible, âgées de 7 semaines, et dont le poids moyen est de 140 g, ont reçu chacune 100 µg du peptide encéphalitogène de Peninsula Laboratories avec 1 mg de
10 Mycobactérium tuberculosis (DIFCO) dans 100 µl d'une émulsion de sérum physiologique et d'adjuvant complet de Freund (ACF H37Ra, DIFCO). Les rates reçoivent 50 µl dans la voûte plantaire des pattes arrières. Le peptide encéphalitogène (PE) a la séquence suivante :

Tyr-Gly-Ser-Leu-Pro-Gln-Lys-Ser-Gln-Arg-Ser-Gln-Asp-Glu-Asn.

15 Les rates provenaient du Centre d'Elevage Janvier. Durant toutes les expérimentations, les animaux ont été mis dans les conditions d'élevage requises par la législation. On injecte aux rates le mélange encéphalitogène (PE et Mycobactérium) puis on les répartit de façon aléatoire dans chaque groupe.

Les animaux ont été observés cliniquement tous les jours ouvrables après
20 administration de l'émulsion encéphalitogène. Les tests sont basés sur quelques critères portant sur :

- la démarche ;
- l'agrippement (force musculaire) ;
- la réception sur le sol lisse après saut ;
- 25 - la sensibilité et l'hypotonie de la queue.

On a également observé le comportement, le tonus de chaque animal et noté l'évolution de son poids. Un score clinique a été ainsi attribué :

- 0 : pas de signes ;
- 0,5 : peu actif et perte de poids ;
- 30 1 : hypotonie de la queue ;
- 2 : faiblesse des membres inférieurs ;
- 3 : hémiparésie ;
- 4 : tétraplégie, état moribond.

Un score égal ou supérieur à 2 était requis pour affirmer le handicap neurologique (poussée d'EAE ou d'EAE-CR). Si ce score établi régresse, les animaux sont en phase de rémission. Par contre, lorsque ce score clinique revient à une valeur au moins égale à 2, les animaux font une rechute (deuxième poussée).

Une attention particulière a été portée pour différencier les signes neurologiques de l'atteinte articulaire arthritique. L'état inflammatoire des pattes a été apprécié de la façon suivante (score arthritique) :

- 1 et 2 : odème de la patte (ne gênant pas la marche) ;
- 3 et 4 : grosses pattes inflammatoires ;
- 5 et 6 : oedème de la patte gênant la marche ou pattes très inflammatoires ;
- 7 et plus : gros oedème et forte inflammation, gêne, ulcération.

Les résultats sont les suivants :

- 1 - évolution pondérale moyenne par rapport au groupe contrôle

Comme on peut le voir sur la figure 2, l'évolution pondérale moyenne du groupe traité avec le copolymère SPD_{0,7}W_{0,3}-G n'est pas différente de celle du groupe contrôle.

- 2 - évolution du score arthritique moyen

Comme on peut le voir sur la figure 3, l'évolution du score arthritique moyen du groupe traité avec le copolymère SPD_{0,7}W_{0,3}-G n'est pas différente de celle du groupe contrôle.

- 3 - évolution du score encéphalitique moyen.

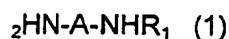
Comme on peut le voir sur la figure 4, l'intérêt du copolymère SPD_{0,7}W_{0,3}-G, est confirmé : le composé n'est pas suffisant pour abolir la crise encéphalique, mais il la réduit de moitié dans son intensité et sa durée. Ici, il a été administré 12 jours avant la survenue de la crise.

Dans les trois cas ci-dessus, on obtient des résultats comparables lorsqu'on remplace le tryptophane par la cystéine ou la tyrosine.

REVENDEICATIONS

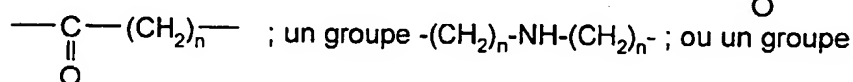
1. Composé susceptible de piéger des ions métalliques, choisi parmi :

- 5 * une polyamine susceptible d'être obtenue soit par polymérisation d'un agent réticulant et d'une diamine de formule (1) ou d'un mélange de diamines de formule (1) :



dans laquelle

- 10 - A représente un (C₁-C₆)alkylène ou alkylidène, éventuellement substitué par un ou plusieurs carboxyles ; un groupe $\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---}\overset{\text{O}}{\underset{\text{||}}{\text{C}}}\text{---}$; un groupe

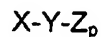


$\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---NH---}(\text{CH}_2)_n\text{---NH---}(\text{CH}_2)_n\text{---}$; chaque entier n pouvant prendre les valeurs 1 à 6 ; et

- R₁ représente l'hydrogène ou un (C₁-C₆)alkyle éventuellement substitué par un
15 ou plusieurs carboxyles et/ou un imidazolyle, soit par polymérisation sur elle-même d'une molécule comportant à la fois une fonction amine primaire et une fonction aldéhyde protégée sous forme d'acétal, soit par réduction d'un polyamide ;

* un mélange de polyamines telles que définies ci-dessus ; et

- 20 * un conjugué de formule :



dans laquelle

- X et Z représentent indépendamment une diamine de formule (1) ou une polyamine ou un mélange de polyamines tels que définis ci-dessus ; Z peut aussi
25 représenter une molécule porteuse telle que la polylysine et l'albumine sérique bovine ;

- Y représente une liaison directe ou le résidu de l'anhydride succinique ou glutarique ; et

- p est un entier variant de 1 à 3 ;

- 30 étant entendu que lorsque Y représente l'anhydride succinique ou glutarique et X représente une diamine de formule $_2\text{HN-A-NHR}_1$, dans laquelle

* A est un (C₁-C₈)alkylène, un groupe -(CH₂)_n-NH-(CH₂)_n- ou un groupe -(CH₂)_n-NH-(CH₂)_n-NH-(CH₂)_n- et R₁ est l'hydrogène, ou

* A est un groupe -(CH₂)₂-C(O)- et R₁ est un groupe (imidazol-5-yl)carboxyméthyle,

5 Z ne représente pas la polylysine.

2. Composé selon la revendication 1, qui est un mélange de polyamines.

3. Composé selon la revendication 1, qui est un conjugué de formule X-Y-Z dans laquelle X représente une diamine de formule (1), Y représente le résidu de l'anhydride succinique ou glutarique et Z représente un mélange de polyamines.

10 4. Composé selon la revendication 1, qui est un conjugué de formule X-Y-Z_p dans laquelle X représente une polyamine, Y représente une liaison directe, Z représente une diamine de formule (1) et p vaut 1 ou 2.

5. Composé selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel chaque polyamine du mélange de polyamines est obtenue par polymérisation d'une
15 diamine de formule (1) distincte.

6. Composé selon l'une des revendications 1 à 5, dans lequel la diamine de formule (1) est choisie parmi la L-ornithine, la cadavérine, la putrescine, la L-carnosine, la spermidine et la spermine.

7. Composé selon l'une des revendications 1 à 3 ou 5, dans lequel le
20 mélange de polyamines est un mélange de poly(L-ornithine), poly(putrescine), poly(cadavérine), poly(spermidine) et de poly(spermine).

8. Procédé pour récupérer des ions métalliques en solution, qui comprend les étapes suivantes :

- la mise en contact d'une solution contenant des ions métalliques avec
25 un composé tel que défini ci-après pour former un complexe ;

- le passage du complexe sur un dispositif de filtration pour retenir ou filtrer le complexe ; et

- la récupération des ions métalliques par traitement à l'aide d'une solution acide du complexe retenu ou filtré ;

30 ledit composé étant choisi parmi :

* une polyamine susceptible d'être obtenue soit par polymérisation d'un agent réticulant et d'une diamine de formule (1) ou d'un mélange de diamines de formule (1) :



dans laquelle

- A représente un (C₁-C₈)alkylène ou alkylidène, éventuellement substitué par un ou plusieurs carboxyles ; un groupe $\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{---}$; un groupe

$\text{---}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---}$; un groupe $\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---NH---}(\text{CH}_2)_n\text{---}$; ou un groupe

$\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---NH---}(\text{CH}_2)_n\text{---NH---}(\text{CH}_2)_n\text{---}$; chaque entier n pouvant prendre les valeurs 1 à

5 6 ; et

- R₁ représente l'hydrogène ou un (C₁-C₈)alkyle éventuellement substitué par un ou plusieurs carboxyles et/ou un imidazole, soit par polymérisation sur elle-même d'une molécule comportant à la fois une fonction amine primaire et une fonction aldéhyde protégée sous forme d'acétal, soit par réduction d'un

10 polyamide ;

* un mélange de polyamines telles que définies ci-dessus ; et

* un conjugué de formule :



dans laquelle

15 - X et Z représentent indépendamment une diamine de formule (1) ou une polyamine ou un mélange de polyamines tels que définis ci-dessus ; Z peut aussi représenter une molécule porteuse telle que la polylysine et l'albumine sérique bovine ;

- Y représente une liaison directe ou le résidu de l'anhydride succinique ou
20 glutarique ; et

- p est un entier variant de 1 à 3.

9. Procédé selon la revendication 8, dans lequel le composé est tel que défini dans l'une des revendications 2 à 7.

10. Procédé selon la revendication 8 ou 9, dans lequel le dispositif de
25 filtration est une colonne de chromatographie par affinité, le pH de ladite colonne étant maintenu à une valeur supérieure ou égale à 8 lors du passage du complexe.

11. Procédé selon l'une des revendications 8 à 10, qui comprend en outre le recyclage dudit composé.

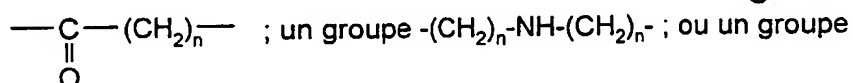
30 12. Utilisation d'un composé choisi parmi :

* une polyamine susceptible d'être obtenue soit par polymérisation d'un agent réticulant et d'une diamine de formule (1) ou d'un mélange de diamines de formule (1) :



5 dans laquelle

- A représente un $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ alkylène ou alkylidène, éventuellement substitué par un ou plusieurs carboxyles ; un groupe $\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---}\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\parallel}}\text{C}\text{---}$; un groupe

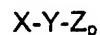


$\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---NH---}(\text{CH}_2)_n\text{---NH---}(\text{CH}_2)_n\text{---}$; chaque entier n pouvant prendre les valeurs 1 à 6 ; et

10 - R_1 représente l'hydrogène ou un $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ alkyle éventuellement substitué par un ou plusieurs carboxyles et/ou un imidazolyle, soit par polymérisation sur elle-même d'une molécule comportant à la fois une fonction amine primaire et une fonction aldéhyde protégée sous forme d'acétal, soit par réduction d'un polyamide ;

15 * un mélange de polyamines telles que définies ci-dessus ; et

* un conjugué de formule :



dans laquelle

20 - X et Z représentent indépendamment une diamine de formule (1) ou une polyamine ou un mélange de polyamines tels que définis ci-dessus ; Z peut aussi représenter une molécule porteuse telle que la polylysine et l'albumine sérique bovine ;

- Y représente une liaison directe ou le résidu de l'anhydride succinique ou glutarique ; et

25 - p est un entier variant de 1 à 3 ;

pour le traitement des eaux contaminées.

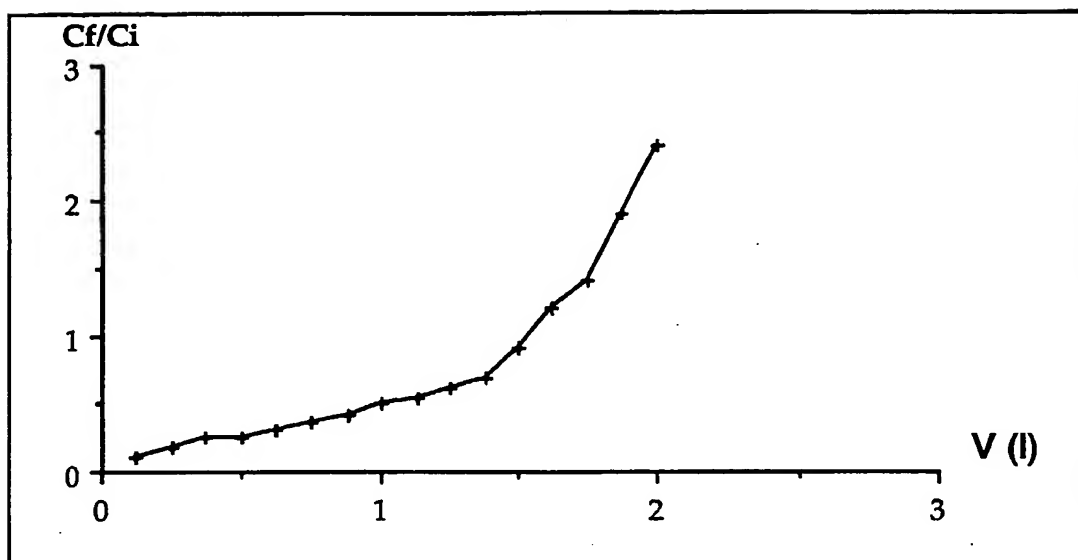
$1/4$ 

FIG.1

2/4

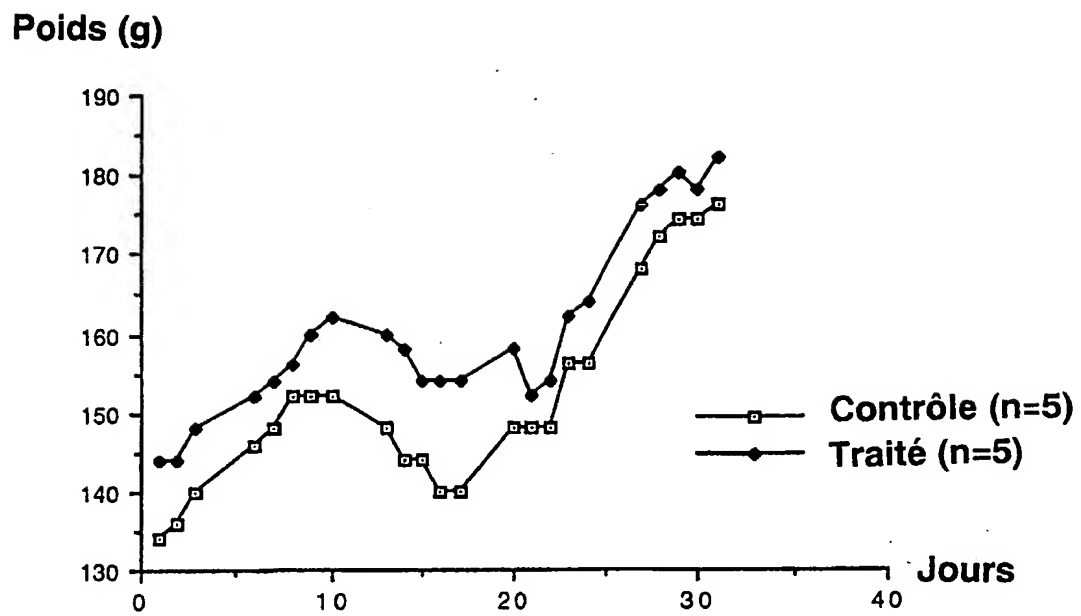


FIG.2

3/4

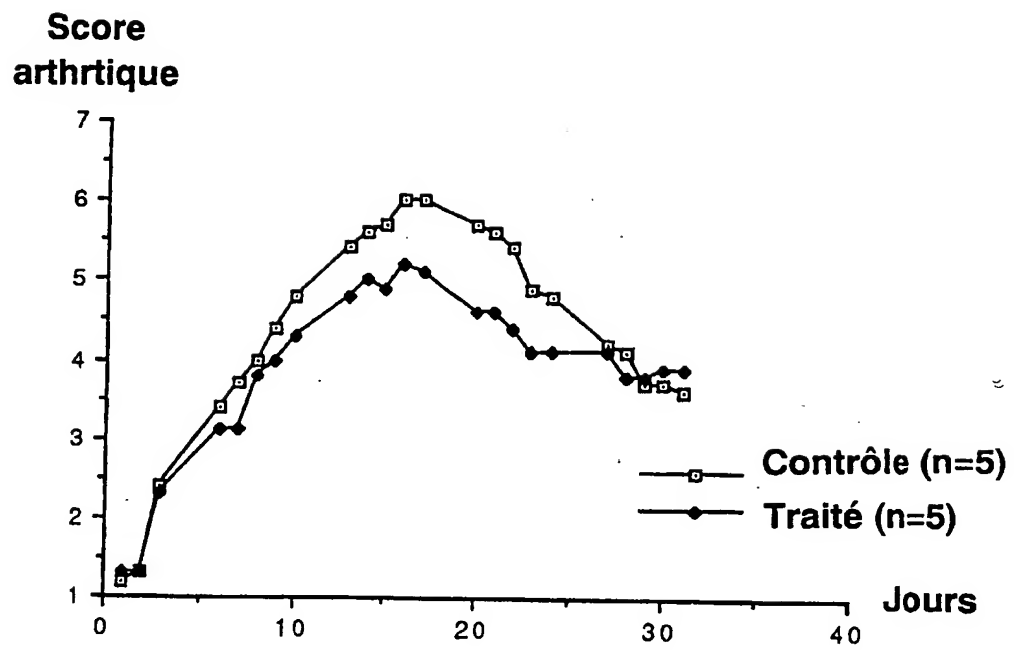


FIG.3

4/4

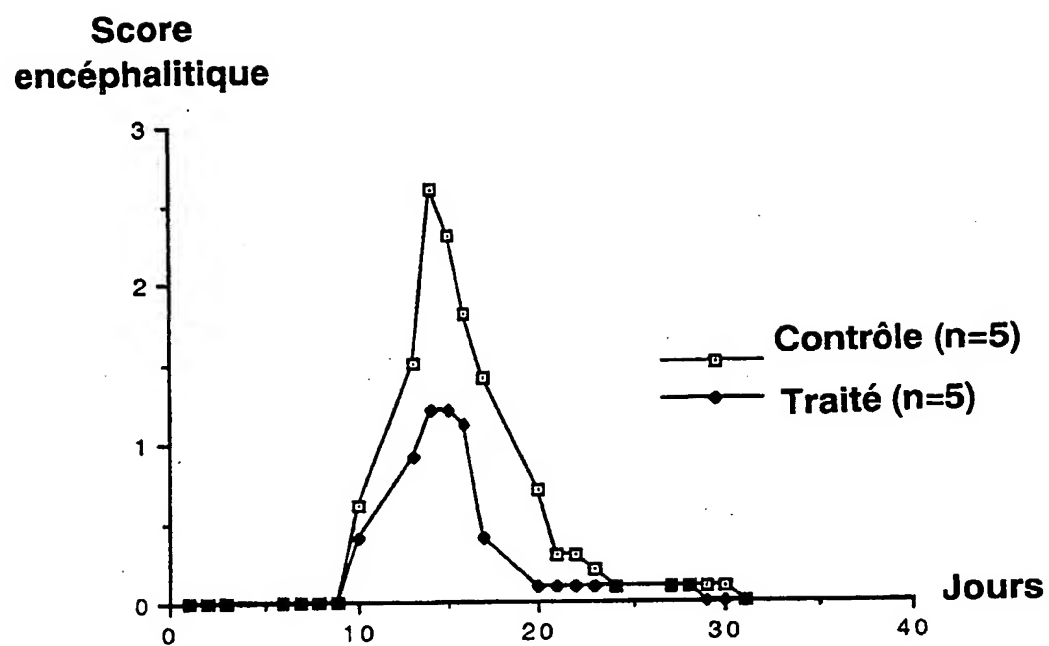


FIG.4

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	DE 22 30 593 A (KYOWA HAKKO KOGYO) 28 décembre 1972 * page 1, alinéa 1; revendications *	1,8,12
D,X	WO 96 15810 A (GEFFARD MICHEL) 30 mai 1996 * le document en entier *	1-7
X	WO 96 38493 A (UNIVERSITY OF CALIFORNIA ET AL.) 5 décembre 1996 * revendications *	1,12
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C08G A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
5 octobre 1998		Boeker, R
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		